

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-14622

(P2003-14622A)

(43) 公開日 平成15年1月15日 (2003.1.15)

(51) Int.Cl.⁷

識別記号

F I

テーマコード(参考)

G 0 1 N 21/27

G 0 1 N 21/27

C 2 G 0 5 9

審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全 12 頁)

(21) 出願番号 特願2001-195504(P2001-195504)

(22) 出願日 平成13年6月27日 (2001.6.27)

(71) 出願人 000005968

三菱化学株式会社

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

(72) 発明者 宗林 孝明

神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地

三菱化学株式会社内

(74) 代理人 100092978

弁理士 真田 有

Fターム(参考) 2G059 AA01 BB12 DD12 DD13 EE02

EE04 FF03 GG01 GG02 JJ19

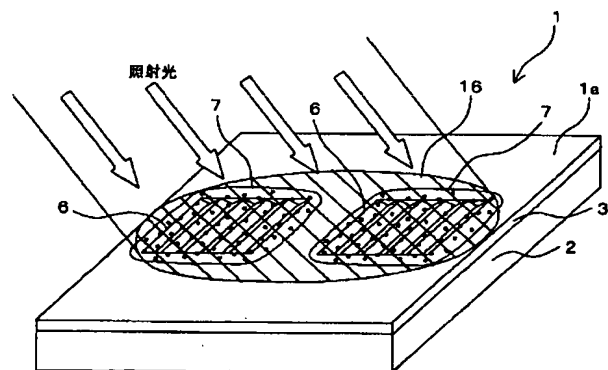
JJ30 KK01 MM01

(54) 【発明の名称】 表面プラズモン共鳴センサチップ及びそれを用いた試料の分析方法

(57) 【要約】

【課題】 回折格子型の表面プラズモン共鳴センサチップに関し、測定点の面積を厳密に制御してばらつきのない均一なシグナルを得ることを可能にする。

【解決手段】 照射光を照射した時に表面プラズモン共鳴現象が起きる共鳴領域6をセンサチップ1のセンサ面1a内に部分的に形成しておき、この共鳴領域6を覆うように結合物質7をセンサ面1a上に塗布し、且つ、この共鳴領域6の全体を照らすように照射光を照射することで、共鳴領域6の面積によって測定点の面積をコントロールする。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 試料と接するセンサ面と、上記センサ面の近傍に設けられ表面プラズモン波を誘起しうる金属層と、上記センサ面の近傍に設けられ照射光の照射によりエバネッセント波を生じさせる回折格子とを備えた表面プラズモン共鳴センサチップにおいて、照射光の照射により上記表面プラズモン波と上記エバネッセント波との共鳴現象が生じうる共鳴領域が上記センサ面内に部分的に形成されるとともに、試料中の検出種と特異的に結合する結合物質が固定化された反応領域が上記共鳴領域を覆うように上記センサ面内に設けられていることを特徴とする、表面プラズモン共鳴センサチップ。

【請求項2】 上記金属層が設けられた領域内に上記回折格子が部分的に形成されることによって上記共鳴領域が形成されていることを特徴とする、請求項1記載の表面プラズモン共鳴センサチップ。

【請求項3】 上記回折格子が形成された領域内に上記金属層が部分的に設けられることによって上記共鳴領域が形成されていることを特徴とする、請求項1記載の表面プラズモン共鳴センサチップ。

【請求項4】 上記回折格子と上記金属層とが設けられた領域上にシール膜が積層され、上記シール膜から露出する露出部分によって上記共鳴領域が形成されていることを特徴とする、請求項1記載の表面プラズモン共鳴センサチップ。

【請求項5】 上記共鳴領域が上記センサ面内に複数個所設けられていることを特徴とする、請求項1～4の何れかの項に記載の表面プラズモン共鳴センサチップ。

【請求項6】 請求項1～5の何れかの項に記載の表面プラズモン共鳴センサチップを用いて試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うための分析方法であって、上記センサ面に上記試料を接触させるステップと、上記共鳴領域の全体を照らすように照射光を照射するステップと、

上記表面プラズモン共鳴センサチップからの反射光を検出するステップと、

検出した反射光の強度に基づき試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うステップとを備えたことを特徴とする、分析方法。

【請求項7】 請求項5記載の表面プラズモン共鳴センサチップを用いて試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うための分析方法であって、

上記センサ面に上記試料を接触させるステップと、上記複数の共鳴領域の全体を照らすように照射光を照射するステップと、

上記表面プラズモン共鳴センサチップからの反射光を検出するステップと、

検出した反射光から各共鳴領域からの反射光を抽出するステップと、

抽出した各共鳴領域からの反射光の強度に基づき試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うステップとを備えたことを特徴とする、分析方法。

【請求項8】 基体に形成された凹凸形状に沿って表面プラズモン波を誘起しうる金属層が積層されることにより、照射光の照射によりエバネッセント波を生じさせる回折格子が上記金属層の表面に現されるとともに、上記金属層が積層された側の表面が試料と接するセンサ面として機能しうる表面プラズモン共鳴センサチップにおいて、

上記凹凸形状が上記基体の表面に複数個所部分的に形成されるとともに、上記複数の凹凸形状を覆うように上記金属層が上記基体の表面に積層されることにより、上記表面プラズモン波と上記エバネッセント波との共鳴現象が生じうる共鳴領域が上記センサ面内に複数個所形成されていることを特徴とする、表面プラズモン共鳴センサチップ。

【請求項9】 基体に形成された凹凸形状に沿って表面プラズモン波を誘起しうる金属層が積層されることにより、照射光の照射によりエバネッセント波を生じさせる回折格子が上記金属層の表面に現されるとともに、上記金属層が積層された側の表面が試料と接するセンサ面として機能しうる表面プラズモン共鳴センサチップにおいて、

上記凹凸形状が上記基体の表面全面或いは上記基体の一部表面に形成されるとともに、上記凹凸形状が形成された領域内に上記金属層が複数個所部分的に積層されることにより、上記表面プラズモン波と上記エバネッセント波との共鳴現象が生じうる共鳴領域が上記センサ面内に複数個所形成されていることを特徴とする、表面プラズモン共鳴センサチップ。

【請求項10】 基体に形成された凹凸形状に沿って表面プラズモン波を誘起しうる金属層が積層されることにより、照射光の照射によりエバネッセント波を生じさせる回折格子が上記金属層の表面に現されるとともに、上記金属層が積層された側の表面が試料と接するセンサ面として機能しうる表面プラズモン共鳴センサチップにおいて、

上記金属層上にシール膜が積層されるとともに、上記金属層の表面が上記シール膜から露出する露出部分が複数個所形成され、少なくとも上記基体の上記露出部分に対応する表面に上記凹凸形状が形成されることにより、上記表面プラズモン波と上記エバネッセント波との共鳴現象が生じうる共鳴領域が上記センサ面内に複数個所形成されていることを特徴とする、表面プラズモン共鳴センサチップ。

【請求項11】 請求項8～10の何れかの項に記載の表面プラズモン共鳴センサチップを用いて試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うための分析方法であって、

上記複数の共鳴領域のそれぞれを覆うように上記試料中の検出種と特異的に結合する結合物質を上記センサ面に固定化するステップと、

上記センサ面に上記試料を接触させるステップと、

上記複数の共鳴領域の全体を照らすように照射光を照射するステップと、

上記表面プラズモン共鳴センサチップからの反射光を検出するステップと、

検出した反射光から各共鳴領域からの反射光を抽出するステップと、

抽出した各共鳴領域からの反射光の強度に基づき試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うステップとを備えたことを特徴とする、分析方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、表面プラズモン共鳴 (SPR) を利用した試料分析のためのセンサチップ (表面プラズモン共鳴センサチップ) の構造に関し、特に、エバネッセント波を誘起する光学構造として回折格子を備えたセンサチップの構造に関する。

【0002】

【従来の技術】従来、生化学や医療検査等の分野においては、化学種、生化学種又は生物種等の検出種を含む試料流体の定量的及び／又は定性的な分析方法として、表面プラズモン共鳴 (SPR) を利用した分析方法が知られている。表面プラズモン共鳴は、金属層に光が入射した場合に金属表面に誘起される表面プラズモン波が入射光により生成されたエバネッセント波に共鳴して励起される現象である。表面プラズモン共鳴は入射光の波長及び角度に依存しており、表面プラズモン共鳴が励起されたときには、特定の入射角又は特定の波長を有する光成分の光エネルギーが表面プラズモン波へ移行することにより、対応する入射角又は波長を有する反射光が減少するという特徴がある。

【0003】表面プラズモン共鳴を起こすためには、特定の表面プラズモン波を有する金属と、表面プラズモン波と共鳴するエバネッセント波を誘起する光学構造とが必要となる。エバネッセント波を誘起する光学構造としては現在二つの構造が知られている。一つはプリズムの全反射を利用した光学構造であり、もう一つは回折格子を利用した光学構造である。なお、上記の金属にこれらの光学構造を組み合わせた素子は一般に表面プラズモン共鳴センサチップ (以下、単にセンサチップという) と呼ばれている。

【0004】通常、センサチップは基体に金属層を積層した構造を有し、金属層上には、特定の検出種と相互作用して特異的に結合する結合物質 (リガンド、分子認識素子) が塗布されて固定化される。このリガンドが固定化された金属層の表面に試料を接触させることにより、リガンドに試料中の検出種が捕捉される。表面プラズモ

ン共鳴は金属層の表面における媒質の屈折率にも依存しており、媒質の屈折率が変化すれば波長一定の場合には共鳴角が変化し、また、入射角度一定の場合には共鳴波長が変化する。したがって、反射光の強度に基づき共鳴角或いは共鳴波長を調べることで金属層の表面における媒質の屈折率を分析することができる。この場合、金属層の表面の媒質の屈折率の変化は、リガンドに捕捉される検出種の物質質量、すなわち試料中の検出種の濃度の変化に対応していることから、表面プラズモン共鳴が起きる共鳴角或いは共鳴波長を調べることで、試料中の検出種の濃度等を分析することができる。

【0005】このようなセンサチップのうち、プリズム型のセンサチップは、一般にセンサチップ本体 (透明基体上に金属層が積層されたもの) とプリズムとから構成されている。センサチップは基本的には使い捨てであるが、プリズムは高価であるため、センサチップ本体だけでなくプリズムまでも使い捨てにすると測定コストが非常に高くなってしまふ。このため、この型のセンサチップでは、一般にセンサチップ本体とプリズムが別で、使用時にプリズムをセンサチップ本体に密着させてプリズムに光を入射し、反射光を検出し測定するようになっている。

【0006】このようにセンサチップ本体とプリズムとが別の場合、使用時には、センサチップ本体とプリズムとの密着性を上げるためにマッチングオイルを間に挟んで密着させる場合が多い。しかし毎回同じ状態に密着させるのは非常に困難で、測定の度に密着度合いのばらつきが大きく、したがって測定値のばらつきが大きいという課題がある。この対策例として、特開2000-121551号公報に開示されているように補正用の標準液を測定することでセンサチップ間の測定値のばらつきを補正する方法が提案されている。しかしながら、この場合、標準液を供給するための新たな送液系が必要になり、また、センサチップ本体も標準液の供給をうけることができるように特別な構造を必要とする。

【0007】一方、回折格子型のセンサチップは、通常、図12に示すように表面に凹凸形状 (グレーティング) 103を有する透明基体101上に金属層102を積層された構造になっている。凹凸形状103上に金属層102が積層されることで金属層102の表面にも凹凸形状104が現れ、この金属層102の表面の凹凸形状104が回折格子として機能する。この型のセンサチップは、プリズム型のように高価なプリズムを使用しないため安価であり、使い捨てが可能である。また、プリズム型のようにプリズムとセンサチップ本体を密着させる作業が不要のため、密着度合いのばらつきといった不具合もなく測定値の再現性が良いという利点もある。

【0008】また、プリズム型のセンサチップではプリズムを入射光及び反射光の経路とするという構造上、ビームの径やビームを照射できる領域に制約があるが、回

折格子型のセンサチップにはこのような制約はなく、大径のビームを使用することができ、また任意の位置にビームを照射することができる。したがって、回折格子型によればプリズム型に比較して一度に大面積を検査することができ、またセンサチップ上の任意の位置について検査することができるという利点がある。

【0009】今日では、分析処理の高速化のため、一つのセンサチップ上において多数の測定点(スポット)について測定を行う多項目測定が行われ、さらに、全スポットについて同時に測定を行う多点同時測定が要望されているが、このような要望に鑑みても、一度に大面積の検査が可能であり、また、金属表面上の任意の位置について検査が可能な回折格子型のセンサチップに対する期待は今日ますます高まっている。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】ところで、上記のような多項目測定においては各スポットからのシグナルに基づき各成分の分析が行われるが、従来のセンサチップ(回折格子型のセンサチップ)はチップ全面からシグナルを生じることが可能な構造であり、本来のスポット以外の位置でも入射光が照射されればシグナルが生じる。このため、反射光にバックグラウンドシグナルが含まれ、これが感度を低下させる可能性がある。

【0011】バックグラウンドシグナルによる影響を防止して、スポットからのシグナルだけを高感度に得られるようにする方法としては、スポットにだけ入射光を照射する方法と、照射光は例えばチップ全面に当たるような広い面積に照射して、反射光の検出時にソフトウェアによる処理によってスポットからのシグナルだけを抽出する方法とが挙げられる。

【0012】前者の場合、スポット毎のシグナルの均一性を高めるには、一定面積(この場合、固定化面積 \geq 照射面積)にのみ入射光を照射するようにすればよい。光源からの照射面積を一定にすることは比較的容易である。しかしながら、この場合、照射面積以上の面積にリガンドを固定化する必要から、それだけリガンドの塗布量が増えてしまい測定コストが増加してしまう。また、一つのスポットにおけるリガンドの面積が大きくなるので、一つのチップ上に形成できるスポットの総数が減少してしまうという欠点もある。さらに、この場合は、全スポットを順次測定することになるが、このような測定方法では測定に時間がかかってしまい分析処理の高速化の要求に十分にこたえることができない。

【0013】一方、後者の方法は、いわゆる多点同時測定による方法であるが、この方法によれば全スポットを同時に測定できるので分析処理の高速化が可能であり、また、例えばCCDを検出器とする場合にはスポット毎に画素数を揃えるという操作によってスポット毎のシグナルの均一性を確保することができる。スポット毎に画素数を揃えるためには、スポットの形状(面積等)自体の

均一性を高めることが重要であるが、これには一定面積(この場合、照射面積 \geq 固定化面積)にのみリガンドを固定化するようにすればよい。

【0014】しかしながら、回折格子型のセンサチップの検出原理を考慮すると金属層の表面(回折格子の表面でもある)に傷をつけずにリガンドを固定化する必要があるが、このような制約のもとで既存の装置により一定の面積でリガンドを固定化することは非常に難しい。この場合には、いわゆるスポッターと呼ばれる分注機の中でも非接触式の原理を有する装置が必要になり、このような装置としてはピエゾ素子などインクジェットプリンターの原理を応用した装置が知られているが、この装置であっても高密度にリガンドを固定化するには必要な精度を得るには不十分であるか、或いは非常に高額な装置でしか対応できない。つまり、通常、リガンドの固定化面積にある程度のばらつきが生じることは避けられない。

【0015】また、スポットよりも小さい面積の画素数を用いることによってもスポット毎に画素数を揃えることも可能であるが、この場合には全スポットのうち最小のスポットに画素数を合わせることになるため、一スポットあたりの画素数が少なくなって測定精度が低下してしまう可能性がある。また、この場合には、スポットの位置(特にスポットの中心位置)を正確に検出する操作も必要となるが、CCDの画像から全スポットの位置を正確に検出することは難しい。

【0016】本発明は、このような課題に鑑み創案されたもので、測定点の面積を厳密に制御してばらつきのない均一なシグナルを得ることを可能にした、表面プラズモン共鳴センサチップ、及びそれを用いた試料の分析方法を提供することを目的とする。

【0017】

【課題を解決するための手段】上記の課題を解決すべく鋭意検討した結果、発明者らは、照射光を照射した時に表面プラズモン共鳴現象が起きる共鳴領域をセンサチップのセンサ面内に部分的に形成しておき、この共鳴領域を覆うように結合物質をセンサ面上に塗布し、且つ、この共鳴領域の全体を照らすように照射光を照射することで、結合物質の塗布量によってではなく共鳴領域の面積によって測定点の面積をコントロールすることができ、ばらつきのない均一なシグナルを得ることができることを見出し、本発明を完成した。

【0018】すなわち、本発明の表面プラズモン共鳴センサチップ(第1のセンサチップ)は、回折格子型の表面プラズモン共鳴センサチップにおいて、照射光の照射により表面プラズモン波とエバネッセント波との共鳴現象が生じうる共鳴領域が試料と接するセンサ面内に部分的に形成されるとともに、試料中の検出種(化学種、生化学種又は生物種等)と特異的に結合する結合物質(抗原抗体反応、相補的DNA結合、リセプター/リガンド

相互作用、酵素／基質相互作用等の相互作用によって検出種を捕捉できる物質)が固定化された反応領域が共鳴領域を覆うようにセンサ面上に設けられていることを特徴としている。

【0019】なお、共鳴領域は、表面プラズモン波を誘起しうる金属層の近傍に照射光の照射によりエバネッセント波を生じさせる回折格子を形成することで実現することができ、特に、金属層が設けられた領域内に回折格子を部分的に形成したり、逆に、回折格子が形成された領域内に金属層を部分的に設けたりすることによって、センサ面に対して部分的に形成することができる。また、回折格子と金属層とが設けられた領域上にシール膜を積層し、一部をシール膜から露出させることによってその露出部分を共鳴領域としてもよい。好ましくはこのような共鳴領域をセンサ面内に複数個所設けるようにする。この場合、各共鳴領域の大きさ(形状)は均一に形成するのがより好ましい。

【0020】そして、この第1のセンサチップを用いて試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うには、センサ面に試料を接触させるステップ、共鳴領域の全体を照らすように照射光を照射するステップ、センサチップからの反射光を検出するステップ、検出した反射光の強度に基づき試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うステップを実行すればよい。これにより、結合物質の塗布量によってではなく共鳴領域の面積によって測定点の面積をコントロールすることが可能になり、ばらつきのない均一なシグナルを得ることが可能になる。なお、これらの各ステップは記載順に実行してもよく、同時に実行してもよい。特に、各ステップを同時に実行する場合には、試料中の検出種が結合物質に結合していく様子をリアルタイムでモニタすることができる。

【0021】特に、共鳴領域をセンサ面に沿って複数個所設けたセンサチップを用いて試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う場合には、センサ面に試料を接触させるステップ、複数の共鳴領域の全体を照らすように照射光を照射するステップ、センサチップからの反射光を検出するステップ、検出した反射光から各共鳴領域からの反射光を抽出するステップ、抽出した各共鳴領域からの反射光の強度に基づき試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うステップを実行することにより、多点同時測定が可能になる。なお、この場合も各ステップは記載順に実行してもよく、同時に実行してもよい。

【0022】また、特に、基体に形成された凹凸形状に沿って表面プラズモン波を誘起しうる金属層が積層されることにより、照射光の照射によりエバネッセント波を生じさせる回折格子が金属層の表面に現されるとともに、金属層が積層された側の表面が試料と接するセンサ面として機能しうるような構造の表面プラズモン共鳴センサチップについては、以下に示す第2～第4のセンサチップのように構成することによって、多点同時測定用

のセンサチップとして使用することが可能になる。

【0023】まず、第2のセンサチップは、凹凸形状が基体の表面に複数個所部分的に形成されるとともに、これら複数の凹凸形状を覆うように金属層が基体の表面に積層されることにより、表面プラズモン波とエバネッセント波との共鳴現象が生じうる共鳴領域がセンサ面内に複数個所形成されていることを特徴としたものである。凹凸形状を部分的に形成することは現在の微細加工技術によれば容易であり、金属層は少なくとも凹凸形状を覆うように積層すればよくスパッタリングや蒸着により基体の表面全面に積層してもよいので、このような構成のセンサチップであれば、極めて容易に製作することができる。また、凹凸形状の形成領域に金属層の積層領域を一致させれば、共鳴領域以外の領域からの反射光を抑制してノイズを低減することもできる。

【0024】第3のセンサチップは、凹凸形状が基体の表面全面或いは基体の一部表面に形成されるとともに、この凹凸形状が形成された領域内に金属層が複数個所部分的に積層されることにより、表面プラズモン波とエバネッセント波との共鳴現象が生じうる共鳴領域がセンサ面内に複数個所形成されていることを特徴としたものである。金属層が形成されていない領域からは光が反射されないため、このような構成のセンサチップであれば、共鳴領域からのみシグナルを得ることができノイズを容易に低減することができる。なお、この場合、マスク等を用いて部分的に金属層を積層するようにしてもよく、基体の表面全面にスパッタリングや蒸着によって金属を積層した後に共鳴領域以外の場所の金属層を剥離するようにしてもよい。

【0025】そして、第4のセンサチップは、金属層上にシール膜が積層されるとともに、金属膜の表面がシール膜から露出する露出部分が複数個所形成され、少なくとも露出部分に対応する基体の表面に凹凸形状が形成されることにより、表面プラズモン波とエバネッセント波との共鳴現象が生じうる共鳴領域がセンサ面内に複数個所形成されていることを特徴としたものである。このような構成のセンサチップであれば、金属層上にシール膜を貼り付けるだけで従来の一般的な回折格子型のセンサチップをそのまま流用することができ、極めて容易に且つ低コストで実現することができる。

【0026】これらのセンサチップを用いて試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う場合には、複数の共鳴領域のそれぞれを覆うように試料中の検出種と特異的に結合する結合物質をセンサ面に固定化しておき、センサ面に試料を接触させるステップ、複数の共鳴領域の全体を照らすように照射光を照射するステップ、センサチップからの反射光を検出するステップ、検出した反射光から各共鳴領域からの反射光を抽出するステップ、及び抽出した各共鳴領域からの反射光の強度に基づき試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うステップを実行す

ばよい。これにより、高精度での多点同時測定が可能になる。この場合も、各ステップは記載順に実行してもよく、同時に実行してもよい。

【0027】なお、回折格子型とは異なるプリズム型のセンサチップにおいて、以前、LEDランプの像よりも金属層の形成領域を小さくすることで、コヒーレントでない光での測定精度を上げようとする試みがあった（特開平9-257697号公報）。これに対して本発明は、回折格子型のセンサチップにおいて試料中の検出種と特異的に結合する結合物質を固定化する反応領域より表面プラズモン共鳴が起きる共鳴領域を小さくすることで、測定精度を向上させるとともに、多点同時測定も可能にするという全く新しい効果を得るものである。

【0028】

【発明の実施の形態】以下、図面を参照しながら本発明の実施の形態について説明する。

(A) 第1実施形態

まず、図1～図5を用いて本発明の第1実施形態について説明する。図1に示すように本実施形態にかかるセンサチップ（表面プラズモン共鳴センサチップ）1は、その表面（センサ面）1aを金属層3により被覆され、金属層3上の複数箇所に回折格子5が部分的に形成されている。本実施形態では、この回折格子5が部分的に形成されている各領域が多点同時測定による分析時の測定点（スポット）6となる。

【0029】この構造によれば、照射光がセンサチップ1のセンサ面1aに照射されると、照射光はセンサ面1a上の回折格子5が形成された各箇所において回折し、この回折現象によりエバネッセント波が生じる。また、照射光が金属層3に作用することにより金属層3の表面に表面プラズモン波が発生し、特定の波長及び入射角の励起光が照射されたときにエバネッセント波と表面プラズモン波とが共鳴し、表面プラズモン共鳴（SPR）が起きる。すなわち、このセンサチップ1では、金属層3上に回折格子5が部分的に形成されている各領域、すなわち各スポット6がそれぞれ共鳴領域となっている。

【0030】このセンサチップ1は、図2(a)に示す基体2の表面に、まず、図2(b)に示すようにレーザ加工等により複数箇所に部分的に凹凸形状4を形成し、次いで、図2(c)に示すように基体2の表面全面にスパッタリングや蒸着により金属層3を積層することで製造することができる。凹凸形状4上に金属層3が積層されることで金属層3の表面にも凹凸形状が現れ、この金属層3の表面の凹凸形状が回折格子5として機能する。なお、金属層3の厚みが小さい場合には、照射光が金属層3を透過して基体2の表面に達し、照射光が基体2表面の凹凸形状4により回折する場合もある。この場合は凹凸形状4も回折格子として機能することになる。

【0031】基体2の材質は、表面に凹凸形状4を形成することができ、金属層3を保持できる機械的強度が十

分であるならばその材質に限定はない。凹凸形状4の形成しやすさからは樹脂が好ましく、アクリル樹脂（ポリメタクリル酸メチルなど）、ポリエステル樹脂（ポリカーボネートなど）などが好適な材質として挙げられる。基体2に形成する凹凸形状4は、金属層3を積層したときにその表面に所望の回折格子5が得られるように金属層3の厚み等を考慮して形成する。形成方法としては、上述のレーザ加工等の他、射出成型によって基体2とともに成型してもよい。凹凸形状4としては、矩形波形状、正弦波形状、鋸歯状形状などがあり得るが、好ましくは回折格子5の溝深さ（頂から谷底まで）が10～200nm（より好ましくは30～120nm）、ピッチ（周期：凹凸の凸から隣接する凸までの距離）が400～1200nm（照射光の波長と関係する）となるような周期的な凹凸形状とする。

【0032】金属層3は、表面プラズモン波を誘起しうるものであればその材質に限定はない。例えば、金、銀、銅、アルミニウムやこれらを含む合金等、或いは銀、銅、アルミニウムの酸化物等を用いることができる。感度や安価な点では銀が好ましいが、安定性の面では金が好ましい。なお、金属層3の厚みは、好ましくは20～300nmとし、より好ましくは30～160nmとする。

【0033】凹凸形状4が形成された各領域の形状、すなわちスポット6の形状は、図1、図2に示すような矩形の他、円形、多角形、楕円形等、種々の形状を選択することができるが、スポット6間には形状及び大きさに差がなく、均一なものであることが好ましい。面積に換算した場合には、ばらつきが±10%、好ましくは±2%以内に収まるようにするのが好ましい。また、スポット6が大きすぎると後述するリガンドが均一に塗布しにくく、且つ1チップ上に多くのスポットが形成できず集積化ができないので、円形なら直径を5mm以下とするのが好ましく、より好ましくは3mm以下とする。矩形なら短辺を5mm以下とするのが好ましく、より好ましくは3mm以下とする。逆にスポット6をあまり小さくすると、リガンドを正確に微量塗布するのが技術的に難しいので、直径または短辺は0.5μm以上とするのが好ましく、より好ましくは2μm以上とする。スポット6が多角形や楕円形等である場合の大きさも上記に準ずるのが好ましい。また、スポット6の形成密度としては、0.1～1,000,000個/cm²が好ましく、1～100,000個/cm²がより好ましい。これにより、1チップあたり、100万個或いは1千万個のスポット6が形成可能になる。

【0034】次に、本実施形態にかかるセンサチップ1の使用方法について説明する。センサチップ1を試料の分析に用いる際には、まず、図3に示すように各スポット6上にリガンド7を固定化する。このリガンド7が固定化された領域が試料中の検出種（化学種、生化学種又

は生物種等)と反応する反応領域となる。リガンド7は、抗原抗体反応、相補的DNA結合、リセプター／リガンド相互作用、酵素／基質相互作用等の相互作用によって特定の物質と特異的に結合しうる性質を備えた結合物質であり、検出すべき検出種に応じたリガンド7が選択される。試料中に複数の検出種が含まれる場合には、各検出種に応じたリガンド7がそれぞれ選択されて、それぞれ別々のスポット6に固定化される。ここで留意するのは、反応領域がスポット6全体を完全に覆うように、すなわち、反応領域の面積がスポット6の面積以上になるようにリガンド7を固定することである。リガンド7の固定は公知の一般的な装置を用いて行うことができる。

【0035】そして、このようにリガンド7が固定化されたセンサチップ1を図4に示す構成の分析装置10にセットして分析を行う。この分析装置10はセンサチップ1を固定するためのホルダ11、光源12、光検出器13及び分析部14から主に構成されている。ホルダ11には検出種を含む試料流体が通過する流路11aが形成されている。センサチップ1はそのセンサ面1aが流路11aを流れる試料に接するように配置されて固定される。

【0036】光源12はセンサチップ1のセンサ面1aに向けて照射光を照射するようにセンサチップ1に対して流路11aを挟んで配置されている。光源12は分析の方法に応じて選択され、共鳴角の変位に基づき分析を行う場合には単色光を光源として用い、最大吸収波長(共鳴波長)の変位に基づき分析を行う場合には白色光を光源として用いる。単色光の光源としては、レーザ光源、特に価格、大きさの点で半導体レーザが好ましく、波長は350～1300nm程度とするのが好ましい。また、ハロゲン・タングステンランプなどの白色光を干渉フィルターや分光器等で分光して得た単色光を光源として用いることも可能である。一方、白色光の光源としては、ハロゲン・タングステンランプ、キセノンランプ等が好ましい。

【0037】光検出器13はセンサチップ1からの反射光を検出する検出器であり、光源12同様にセンサチップ1に対して流路11aを挟んで配置され照射光が回折して生じる0次の回折光の方向に向けられている。したがって、光源12の入射角度が変わる場合には光検出器13のセンサチップ1に対する角度もそれに合わせて変化するようにになっている。光検出器13としては、例えばCCD素子を集積したもの、シリコンフォトダイオードアレイ等が好ましい。なお、図中では省略しているが、P偏光のみが表面プラズモン波を共鳴させることができるため、光源12とセンサチップ1との間、またはセンサチップ1と光検出器13との間には、光源12からの照射光、或いはセンサチップ1からの反射光を偏光するための偏光子を設置する。

【0038】分析部14は光検出器13からの検出情報に基づき分析処理を行う装置である。分析部14は、少なくとも、光検出器13で検出された反射光から各スポット6からのシグナルを抽出する機能と、各スポット6において表面プラズモン共鳴による吸収が最大になる、すなわち各スポット6からのシグナルの強度が最小になる照射光の入射角度或いは波長を算出する機能を有している。

【0039】また、分析部14には検出種の濃度が既知の試料流体を測定して作成した検量線が記憶されている。この検量線は各検出種の濃度と共鳴波長及び共鳴角度との関係を記したものであり、表面プラズモン共鳴が起きた時の共鳴波長及び共鳴角度をこの検量線に照らし合わせることで試料流体中の各検出種の濃度を測定できる。

【0040】上記構成の分析装置10を用いて試料中の各検出種の濃度分析を行う場合、まず、センサチップ1をホルダ11にセットしてセンサチップ1のセンサ面1aを試料に接触させる(ステップA1)。これによりセンサ面1aの各スポット6に固定されたリガンド7に試料流体中の検出種が特異的に結合する。そして、リガンド7に結合した検出種の物質量に応じて各スポット6の金属層3表面近傍の媒質の屈折率が変化し、各スポット6における表面プラズモン波の共鳴条件が変化する。

【0041】次に、光源12からセンサ面1aに向けて照射光を照射する(ステップA2)。このとき、図5に示すように照射光が全てのスポット6を照らすように、すなわち全スポット6が一本の照射光の照射範囲16内に含まれるように照射光の太さを調整する。センサ面1aに照射された照射光は各スポット6に形成された回折格子5において回折光を生じさせる。このうち0次の回折光(反射光)を光検出器13によって検出する(ステップA3)。

【0042】光源12から照射する照射光が単色光、すなわち単一波長の光の場合、光源12を移動させて励起光のセンサチップ1に対する入射角度を変化させていく。同時に、光検出器13により検出された反射光の情報を分析部14においてソフトウェアにより処理し、各スポット6からのシグナルを抽出する。各スポット6からのシグナルの強度は照射光の入射角度に応じて変化し、それぞれある入射角度において最小になる。このシグナルの強度が最小となる入射角度をスポット6毎に分析部14において測定し、測定した角度と照射光の波長とを検量線に対応させて、各スポット6に対応する検出種の濃度を算出する(ステップA4-1)。

【0043】一方、光源12から照射する照射光が白色光の場合は励起光のセンサチップ1に対する入射角度は一定にする。この場合、センサチップ1からの反射光には多成分の光が含まれる。この反射光を分光器(図示略)で波長毎に分光し、これを光検出器13で検出す

る。そして、分光された各成分の光の情報を分析部14においてソフトウェアにより処理し、各スポット6からのシグナルを成分毎に抽出する。各スポット6からのシグナルの強度は波長毎に異なる。このうち強度が最小であるシグナルの波長をスポット6毎に分析部14において測定し、測定した波長と入射角度とを検量線に対応させて、各スポット6に対応する検出種の濃度を算出する(ステップA4-2)。

【0044】なお、これらの各ステップA1~A3、及びA4-1或いはA4-2は、上述のように順に実行する他に同時に実行することも可能である。各ステップを同時実行する場合には、試料中の検出種がリガンド7に結合していく様子をリアルタイムでモニタすることができる。以上のように、本実施形態のセンサチップ1によれば、あらかじめ回折格子5と金属層3とが設けられた一定面積のスポット6、すなわち共鳴領域でしかシグナルを生じないため、リガンド7の固定化面積と照射光の照射範囲とをスポット6の面積よりも大きいものを与えるだけで均一なシグナルを得ることができ、これにより検出精度が上がり定量性が増すという利点がある。また、リガンド7の固定化面積はスポット6を覆る以上であればよく、入射光の照射面積より小さくてよいので、リガンド7の塗布量を減らすことができるといふ利点もある。

【0045】さらに、本実施形態ではスポット6の形状精度は、基体2への凹凸形状4の加工精度により決まるが、現在の微細加工技術を応用することでリガンド7の固定化等と比較して桁違いに高精度な加工が可能である。また、各スポット6からのシグナルを抽出する際のスポット位置の検出に関しても、チップ製造時に高精度にスポット6の形成位置を制御できるため、簡便な探索で反射光から各スポット6からのシグナルを抽出することができる。

【0046】(B) 第2実施形態

次に、図6~図9を用いて本発明の第2実施形態について説明する。図6に示すように本実施形態にかかるセンサチップ(表面プラズモン共鳴センサチップ)21は、その表面(センサ面)21aの複数箇所を金属層23により部分的に被覆されている。センサチップ21の基体22の表面全面には凹凸形状24が形成されており、この凹凸形状24上に金属層23が積層されることで金属層23の表面にも凹凸形状が現れて回折格子25を形成している。本実施形態では、この金属層23が部分的に形成されている各領域が多点同時測定による分析時の測定点(スポット)26となる。

【0047】この構造によれば、照射光がセンサチップ21のセンサ面21aに照射されると、照射光はセンサ面21a上の回折格子25が形成された各個所、すなわち各金属層23の表面において回折する。この回折現象によりエバネッセント波が生じるとともに、照射光が金

属層23に作用することにより金属層23の表面に表面プラズモン波が発生し、特定の波長及び入射角の励起光が照射されたときにエバネッセント波と表面プラズモン波とが共鳴し、表面プラズモン共鳴が起きる。すなわち、このセンサチップ21では、基体22の凹凸形状24上に金属層23が部分的に積層されている各領域、すなわち各スポット26がそれぞれ共鳴領域となっている。

【0048】このセンサチップ21は、図7(a)に示すようにレーザ加工や射出成型により基体22の表面全面に凹凸形状24を形成しておき、図7(b)に示すように適宜の位置に開口28aを形成したマスク28を基体22に載置した状態でスパッタリングや蒸着により金属層23を積層し、その後、図7(c)に示すようにマスク28を除去することで製造することができる。この場合、マスク28の開口部28aを通して積層された金属層23によりスポット6が形成される。

【0049】また、図8(a)に示すようにレーザ加工や射出成型により基体22の表面全面に凹凸形状24を形成しておき、図8(b)に示すように基体22の表面全面にスパッタリングや蒸着により金属層23を積層した後、図8(c)に示すようにエッチング等によりスポット6以外の金属層23を剥離することによっても、上記のセンサチップ21を製造することができる。

【0050】なお、基体22や金属層23の材質は、第1実施形態にかかる基体2や金属層3と同様の材質のものを用いることができる。回折格子25の形状やスポット26の形状及び面積等についても、第1実施形態と同様の形状等とすることができる。本実施形態にかかるセンサチップ21の使用方法是、第1実施形態と同様であり、センサチップ21を試料の分析に用いる際には、図9に示すように各スポット26上にリガンド27を固定化する。本実施形態でも試料中に複数の検出種が含まれる場合には、各検出種に応じたリガンド27をそれぞれ選択し、それぞれ別々のスポット26に固定化する。また、ここでも反応領域(リガンド27が固定化される領域)がスポット26全体を完全に覆うように、すなわち、反応領域の面積がスポット26の面積以上になるようにリガンド27を固定することに留意する。

【0051】そして、本実施形態でも、上記のようにリガンド27が各スポット26に固定化されたセンサチップ21を第1実施形態と同構成の分析装置(図4参照)にセットして分析を行う。この分析装置による分析方法については第1実施形態と同様なので説明は省略するが、ここでも多点同時測定を行う際には全てのスポット26を照らすように、すなわち全スポット26が一本の照射光の照射範囲内に含まれるように照射光の太さを調整することに留意する。

【0052】本実施形態のセンサチップ21によれば、あらかじめ回折格子25と金属層23とが設けられた一

定面積のスポット26、すなわち共鳴領域でしかシグナルを生じないため、リガンド27の固定化面積と照射光の照射範囲とをスポット26の面積よりも大きいものを与えるだけで均一なシグナルを得ることができる等、第1実施形態と同様の利点がある。特に、本実施形態では、センサ面21aのスポット26以外の面には金属層23が積層されていないので、スポット26以外の部位からの反射光を抑制してノイズを低減することができるという利点がある。

【0053】(C) 第3実施形態

次に、図10、図11を用いて本発明の第3実施形態について説明する。図10に示すように本実施形態にかかるセンサチップ(表面プラズモン共鳴センサチップ)31は、その表面(センサ面)31aをシール膜38により覆われ、シール膜38に形成された複数の開口部38aから金属層33の表面が部分的に露出している。金属層33は基体32の表面全面に積層され、金属層33の表面全面には回折格子35が形成されている。本実施形態では、このシール膜38の開口部38aから部分的に露出している各領域が多点同時測定による分析時の測定点(スポット)36となる。

【0054】この構造によれば、照射光がセンサチップ31のセンサ面31aに照射されると、照射光はシール膜38の開口部38aに露出している金属層33の表面において回折格子35の作用によって回折する。この回折現象によりエバネッセント波が生じるとともに、照射光が金属層33に作用することにより金属層33の表面に表面プラズモン波が発生し、特定の波長及び入射角の励起光が照射されたときにエバネッセント波と表面プラズモン波とが共鳴し、表面プラズモン共鳴が起きる。すなわち、このセンサチップ31では、シール膜38の開口部38aから部分的に露出している各領域、すなわち各スポット36がそれぞれ共鳴領域となっている。

【0055】このセンサチップ31は、シール膜38以外の構成は従来の回折格子型センサチップ(図12参照)と同一構成であるので、従来の回折格子型センサチップの表面に、適宜の位置に開口部38aを形成したシール膜38を貼り付けるだけで簡単に製造することができる。開口部38aの形状や面積は、形成したいスポット36の形状や面積に合わせて設定すればよい。なお、シール膜38としては、スポット36以外の場所からの反射を抑制してノイズを低減できるように、照射光に対して透過性が低く、且つそれ自体における反射を抑制するための表面処理が施されているものが好ましい。

【0056】本実施形態にかかるセンサチップ31の使用方法も第1、第2実施形態と同様であり、センサチップ31を試料の分析に用いる際には、図11に示すように各スポット36上にリガンド37を固定化する。本実施形態でも試料中に複数の検出種が含まれる場合には、各検出種に応じたりガンド37をそれぞれ選択し、それ

ぞれ別々のスポット36に固定化する。また、ここでも反応領域(リガンド37が固定化される領域)がスポット36全体を完全に覆うようにリガンド37を固定することに留意する。

【0057】そして、本実施形態でも、上記のようにリガンド37が各スポット36に固定化されたセンサチップ31を第1実施形態と同構成の分析装置(図4参照)にセットして分析を行う。この分析装置による分析方法については第1実施形態と同様なので説明は省略するが、ここでも多点同時測定を行う際には全てのスポット36を照らすように、すなわち全スポット36が一本の照射光の照射範囲内に含まれるように照射光の太さを調整することに留意する。

【0058】本実施形態のセンサチップ31によれば、シール膜38から露出した一定面積のスポット36、すなわち共鳴領域でしかシグナルを生じないため、リガンド37の固定化面積と照射光の照射範囲とをスポット36の面積よりも大きいものを与えるだけで均一なシグナルを得ることができる等、第1、第2実施形態と同様の利点がある。また、スポット36以外の面はシール膜38により覆われているので、第2実施形態と同様にスポット36以外の部位からの反射光を抑制してノイズを低減することができるという利点もある。

【0059】(D) その他

以上、本発明の実施の形態について説明したが、本発明は上述の実施の形態に限定されるものではなく本発明の趣旨を逸脱しない範囲で種々変形して実施することができる。例えば、第1実施形態では、金属層3を基体2の表面全面に積層しているが、凹凸形状4が形成された領域にのみ限定して金属層3を積層するようにしてもよい。金属層3を部分的に積層する方法は、第2実施形態で説明したような方法を用いることができる。これによりスポット6以外の領域からの反射をさらに抑制してノイズを極めて小さくすることが可能になる。

【0060】また、各実施形態では、多点同時測定による試料の分析方法について説明したが、勿論、スポット毎に照射光を照射してスポット毎に順に測定するような分析方法であってもよい。ただし、その場合もスポット全体を照らすように照射光を照射する。また、各実施形態では、センサチップに複数のスポットを設けているが、単一のスポットのみを設けてもよい。この場合もスポットの全体を覆うようにリガンドを固定化し、また、分析時にはスポット全体を照らすように照射光を照射する。

【0061】さらに、各実施形態では、図12に示すような従来の一般的な構造の回折格子型センサチップに本発明を適用した場合について説明したが、本発明は他の様々な構造の回折格子型センサチップにも適用しうるものである。すなわち、試料と接するセンサ面と、センサ面の近傍に設けられ表面プラズモン波を誘起する金属

層と、センサ面の近傍に設けられ照射光の照射によりエバネッセント波を生じさせる回折格子とを備えたセンサチップであれば、照射光の照射により表面プラズモン波とエバネッセント波との共鳴現象が生じうる共鳴領域をセンサ面の近傍に部分的に形成するとともに、試料中の検出種と特異的に結合する結合物質が固定化された反応領域を上記の共鳴領域を覆うようにセンサ面上に設ければよい。そして、分析時には、上記の共鳴領域の全体を照らすように照射光を照射すればよい。

【0062】

【発明の効果】以上詳述したように、本発明によれば、表面プラズモン共鳴センサチップのセンサ面内に部分的に形成された共鳴領域に限定して表面プラズモン共鳴現象が起きるので、この共鳴領域を覆うように結合物質をセンサ面上に塗布して共鳴領域の全体を照らすように照射光を照射することで、共鳴領域を測定点とすることができる。したがって、結合物質の塗布量によってではなく共鳴領域の面積によって測定点の面積をコントロールすることが可能であり、測定点の面積を厳密に制御してばらつきのない均一なシグナルを得ることができるという利点がある。そして、この共鳴領域を複数箇所設けて測定点とすることで、各測定点からのシグナルの測定精度が向上し、精度の高い多点同時測定も可能になるという利点がある。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の第1実施形態にかかるセンサチップの構成を示す模式的な斜視図である。

【図2】図1のセンサチップの製造方法の一例を示す模式的な斜視図であり、(a)～(c)の順に製造手順を示している。

【図3】図1のセンサチップにリガンドを固定化した状態を示す模式的な斜視図である。

【図4】本発明の第1実施形態にかかる分析装置の構成を示す模式的な模式図である。

【図5】多点同時測定における図3のセンサチップへの照射光の照射方法を示す模式的な斜視図である。

【図6】本発明の第2実施形態にかかるセンサチップの構成を示す模式的な斜視図である。

【図7】図6のセンサチップの製造方法の一例を示す模式的な斜視図であり、(a)～(c)の順に製造手順を示している。

【図8】図6のセンサチップの製造方法の一例を示す模式的な斜視図であり、(a)～(c)の順に製造手順を示している。

【図9】図6のセンサチップにリガンドを固定化した状態を示す模式的な斜視図である。

【図10】本発明の第3実施形態にかかるセンサチップの構成を示す模式的な斜視図である。

【図11】図10のセンサチップにリガンドを固定化した状態を示す模式的な斜視図である。

【図12】従来のセンサチップの構成を示す模式的な斜視図である。

【符号の説明】

1, 21, 31 センサチップ（表面プラズモン共鳴センサチップ）

1a, 21a, 31a センサ面

2, 22, 32 基体

3, 23, 33 金属層

4, 24, 34 凹凸形状

5, 25, 35 回折格子

6, 26, 36 スポット（共鳴領域）

7, 27, 37 リガンド（結合物質）

10 分析装置

11 ホルダ

11a 流路

12 光源

13 光検出器

14 分析部

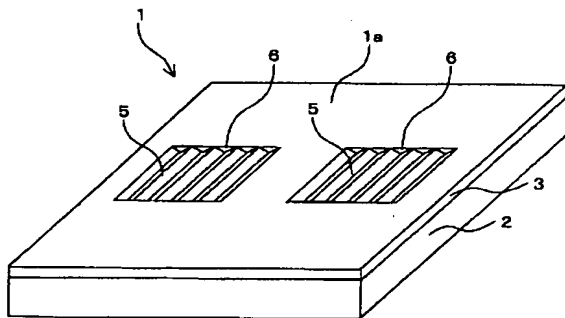
16 照射範囲

28 マスク

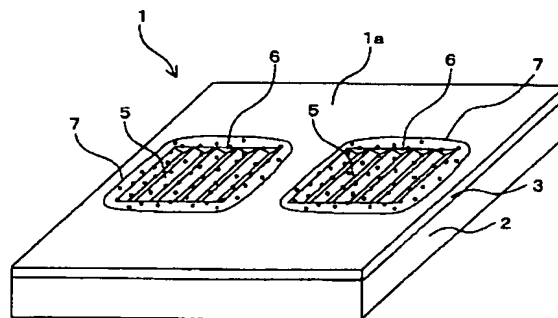
38 シール膜

38a 開口部

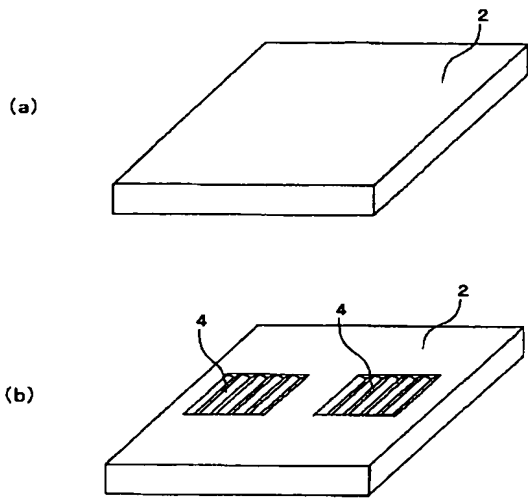
【図1】



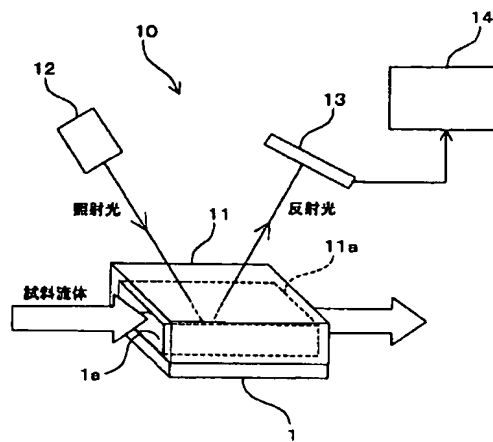
【図3】



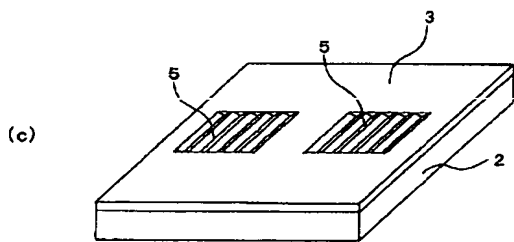
【図2】



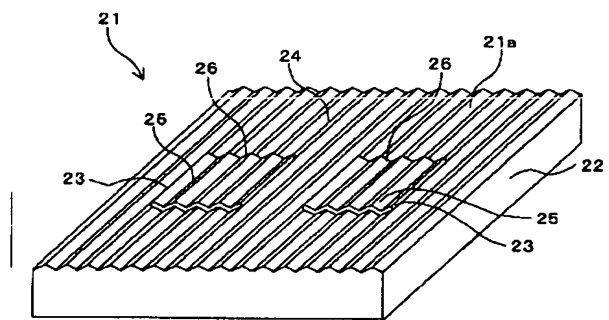
【図4】



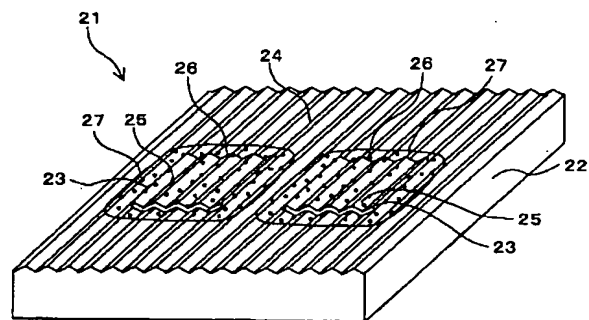
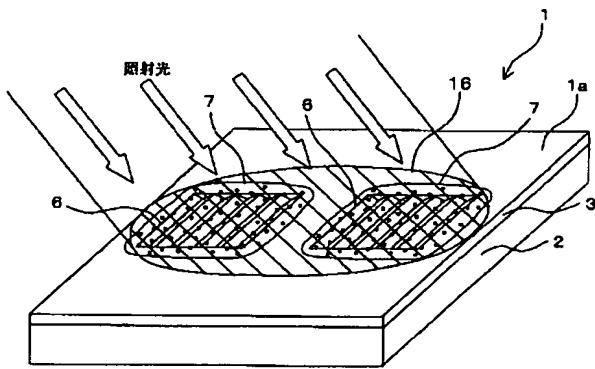
【図6】



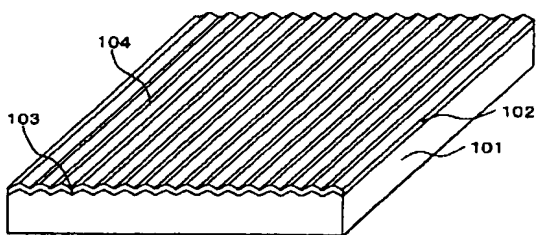
【図5】



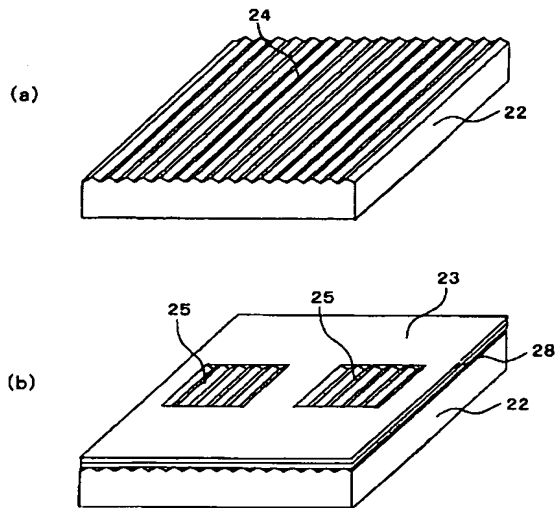
【図9】



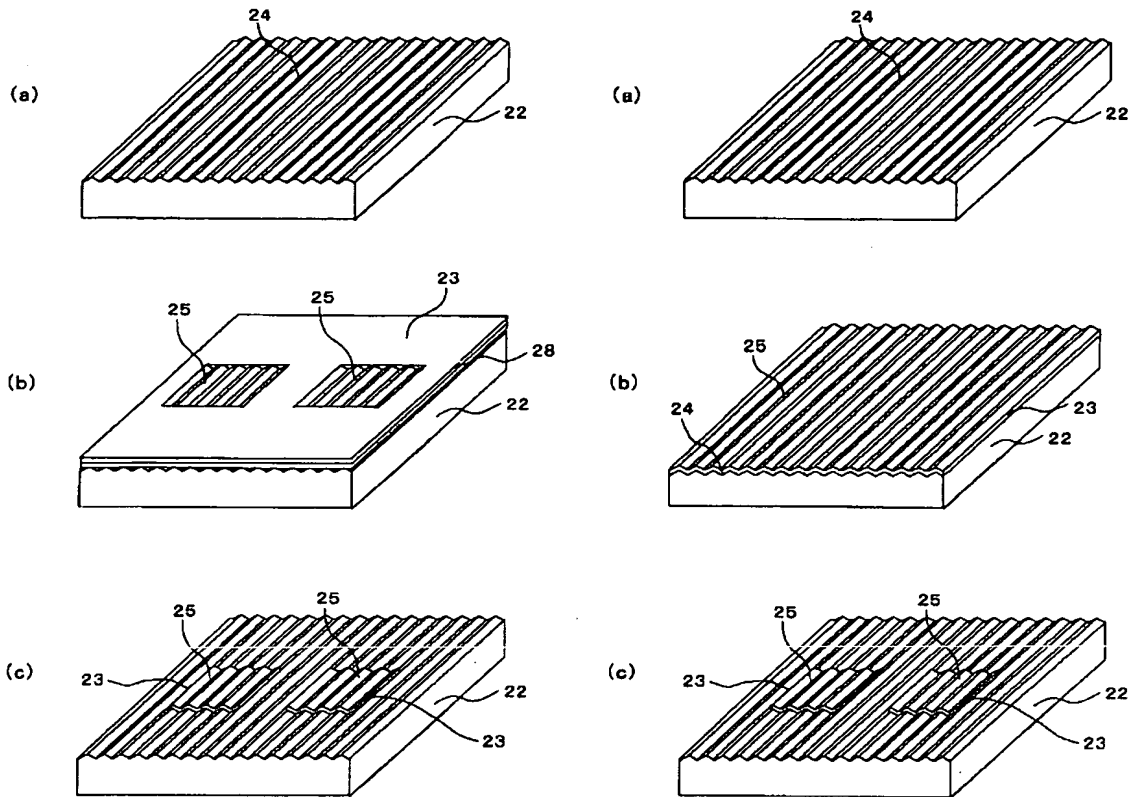
【図12】



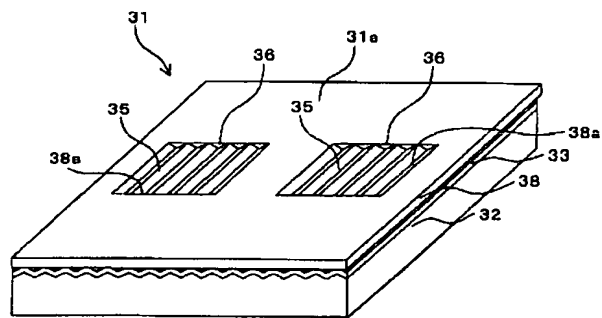
【圖7】



【圖8】



【圖10】



【圖11】

